

知识介绍

用于毛细管电泳分离 DNA 的聚合物介质的研究进展

张文龙, 王延梅*

(中国科学技术大学高分子科学与工程系, 合肥 230026)

摘要:综述了用于毛细管电泳分离 DNA 及测序的聚合物介质的研究进展。这类聚合物主要有均聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、接枝共聚物、共混聚合物、准互穿聚合物网络和微交联纳米凝胶聚合物, 并对各种结构的聚合物的筛分性能进行了比较。

关键词:毛细管电泳; 微芯片毛细管电泳; DNA 分离; DNA 排序

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是上世纪 90 年代初发展起来的新技术, 具有分辨率高、重现性好、灵敏度高、快速和易于实现自动化的特点。毛细管筛分电泳分为凝胶筛分电泳和无胶筛分电泳^[1]。前者以凝胶作为筛分介质, 分离效率高, 但制柱技术要求高, 聚合反应受多种因素(如缓冲液组成、氧含量、引发剂和催化剂浓度以及反应温度等)影响, 易产生气泡, 而造成分离过程的中断。此外, 由于聚合物直接在管内聚合, 一些重要的物理性质(如: 粘度、分子量等)也无法测量。后者一般以非交联的高分子化合物溶液作筛分介质, 由于其具有便于注入和冲出毛细管, 易实现高效自动化分离等优点, 因此在上世纪 90 年代末绝大部分的基因排序中心放弃凝胶电泳而选择使用无胶筛分的自动化毛细管阵列(capillary array electrophoresis, CAE), 这对人类基因组计划的提前完成起到了极大的促进作用^[2]。目前以微芯片毛细管电泳(microchip-based CE capillary electrophoresis, MCE)为核心技术之一的芯片实验室技术正以强劲的势头向生命科学的各个相关领域渗透。芯片实验室把化学或生物化学的实验过程(如稀释、混合、富集及扩增等在内的样品的前处理以及分离和检测等)微缩到一块芯片上^[3]。它用量极微, 速度极快, 得到的信息量可以比常规实验室多几个数量级, 它不仅用于分析, 也可用于反应, 甚至细胞培养, 在临床诊断、药物筛选和生命科学的其它领域都有广泛应用。

无论是毛细管电泳还是微芯片毛细管电泳其筛分介质是影响毛细管分离效率和读写长度的重要因素之一。一般分子量越高、亲水性越强的筛分介质对 DNA 的分离效果越好, 读写长度也越高, 更有利于长片段 DNA 的分离。而相对分子量低的筛分介质, 则有利于小片段 DNA 的分离, 而且体系粘度一般较小, 进样操作和筛分介质替换操作都相对容易^[4]。不同聚合物可以形成不同类型的网络结构, 对最终分离效果有很大的影响, 选择不同类型的单体, 合成具有自涂敷能力和优良筛分性能的聚合物仍然是目前毛细管电泳分离 DNA 研究中的热点。

本文主要综述了近几年来迅速发展的毛细管电泳分离 DNA 及 DNA 测序的无胶筛分介质, 这类聚合物主要有线性均聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、接枝共聚物、共混聚合物、准互穿聚合物网络(Quasi-interpenetrating network, IPNs)和微交联纳米凝胶聚合物(Sparsely cross-linked “nanogels”), 并对各种结构聚合物的筛分性能进行了比较。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(基金号 50373040); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 安徽省人才开发资金(20052026);

作者简介:张文龙(1980-), 男, 硕士生, 从事用于毛细管电泳分离 DNA 介质的合成及其聚集行为的研究。

* 通讯联系人。

1 均聚物

根据毛细管无胶筛分理论^[5], 线形均聚物在溶液内形成交缠网络结构, DNA 分子按照不同的迁移行为通过毛细管柱而得到分离。由于不同聚合物亲水性、分子量大小、自涂敷能力不同, 分离效果也有很大的差别, 目前主要用于 DNA 分离的均聚物主要有以下几种:

1.1 线形聚丙烯酰胺(linear polyacrylamide, LPA)

1993 年, Ruiz-Martinez 等^[6]首次报道了用 LPA 作为 DNA 测序的筛分介质。由于 LPA 具有很强的亲水性, 作为 DNA 的筛分介质可以在较短的分离时间得到较高的读写长度, 故而引起广泛关注。Carrilho 等^[7]在 1996 年用 2% w/v 的 LPA (5.5×10^6 Da), 80 min 内对超过 1000 个碱基对(base pair, bp)的单链 DNA (single-stranded, ssDNA)进行排序, 准确率高达 96.8%。接着 Goetzinger 等^[8]报道了利用氧化还原引发的反相乳液聚合体系合成超高分子量的 LPA(9.0×10^6)的重要方法, 该体系具有粘度低、散热容易、聚合温度低、合成重现性好、存贮时间长等特点。超高分子量的 LPA 在对 ssDNA 排序时, 读写长度也超过 1000 bp, 在前 800 bp 排序中准确率高达 $99.2 \pm 0.1\%$, 对前 900 bp 准确率达 $98.01 \pm 0.3\%$ 。虽然这种方法得到的 LPA 溶液是非牛顿型流体, 当剪切速率增加时, 2% 的 LPA (9.0×10^6 Da)溶液的粘度与 10% LPA (60kDa)溶液的粘度相当, 仍达到 2.7×10^4 cp, 因此无法应用于微芯片毛细管电泳。Marina 等^[9,10]用等离子体引发(plasma-induced polymerization, PIP)丙烯酰胺水溶液自由基聚合反应体系得到分子量超过 1.0×10^7 Da 的 LPA, 1% 的 LPA 水溶液粘度不到 10cp, 在低浓度下(0.2%)LPA 溶液粘度随剪切速率的增加而迅速减少, 在微芯片毛细管中有着广泛的应用前景。由于聚合温度较低(30℃), 得到的 LPA 分散度较传统方法低, 支化或交联也很少, 在用内径 20 μ m, 长 8.5cm 的毛细管对 123bp~1353bp 的双链 DNA (double-stranded, dsDNA)进行分离时取得很好的效果。

1.2 聚环氧乙烷(polyethylene oxide, PEO)

亲水性的 LPA 有着优秀的 DNA 分离能力, 但也存在一些不足, 其一是 LPA 不具有自涂敷能力, 这就需要对于毛细管内壁进行预处理, 以减少或消除电渗流, 减少 DNA 与管壁间的相互作用, 但步骤繁琐, 代价昂贵, 而且重现性差。Yeung 小组在 1995 年^[11]首次报道了无交联的 PEO 用于 DNA 的分离, 在使用空柱对 DNA 分离过程中发现 PEO 具有优秀的筛分能力和自涂敷能力。为了达到较好的涂敷效果, 在每次运行后都要用 0.1M 的 HCl 溶液对毛细管进行冲洗, 但运行过后需要冲洗 2h^[12], 浪费了大量的时间。在对 PEO 组成的研究中发现^[4], 总浓度不变条件下, 在分子量的 PEO 溶液中加入低分子量的 PEO, 小片段的 DNA 的分离效果明显提高。一般认为这是由于短链高分子优先与小片段 DNA 相互作用, 长链高分子主要与大的 DNA 片段相互作用, 但目前 PEO 在 DNA 排序分析中的应用报告还很少。

1.3 纤维素及其衍生物

有些纤维素衍生物作为缓冲液添加剂能有效地屏蔽硅烷醇基, 减少分析物与内壁间的相互作用。甲基纤维素(methylcellulose, MC)已经被许多科研小组研究^[13~16]过。在 700V/cm、浓度为 0.5% 的 MC 能在 4min 内对 100~500 bp 的 DNA 小片段实现很好的分离, 平均理论塔板数达到 $2.5 \times 10^6/\text{m}$ ^[17]。羟乙基纤维素(hydroxyethylcellulose, HEC)是一种线形的、带有大量亲水性基团的聚合物, 水溶液中由于这些基团的作用能够形成稳定的结构, 因此被一些小组广泛地用于分离 DNA^[18~22], 这种介质粘度特别大, 但在较低浓度(0.35% w/w)下 2.7×10^4 Da 的 HEC 仍能对 Φ X174/Hae III dsDNA 很好地分离^[23]。羟丙基纤维素(hydroxypropylcellulose, HPC)的粘度比同样条件下用于 DNA 分离的 HEC 溶液低 2~3 倍^[24], 而且具有自涂敷功能, 适于空柱操作, 因此被更多地用于 DNA 的分离^[25,26], Sanders 等^[27]使用新的缓冲体系, 用 5% HEC (2.5×10^5 Da)通过人工神经网络优化分离条件, 用毛细管电泳和芯片化毛细管电泳对 Φ X174-Hae III dsDNA 分离, 得到很好的结果。羟丙基甲基纤维素(hydroxypropylmethylcellulose, HPMC)也被广泛地用于 DNA 的分离^[28~33], HPMC-4000(2% 的溶液粘度为 4.0×10^3 cp, 25℃)能够用来很好地分离 dsDNA, Baba 等^[25]系统地比较了 MC, HPMC 和 HPC 在 dsDNA 分离的效果, 发现高浓度(0.7%~0.9%)的 HPMC 有利于分离小片段的 DNA 片段, 低浓度(0.4%~0.5%)的 HPMC 对大片段 DNA 分离效果较好。

1.4 聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺 (poly *N,N*-dimethylacrylamide, PDMA)

PDMA 是另一种优良的 DNA 筛分介质^[34]。同其它报道的介质(PVP, PEO, LPA 等)相比, PDMA 具有更好的自涂敷能力^[35], 低分子量的 PDMA 溶液能够很好地对小片段 DNA 进行排序, 其粘度仅为 75cp, 比传统使用的 LPA 溶液低几个数量级, 低压进样 1min 后就能使用, 且毛细管柱再生程序简单, 每次运行以后洗脱, 然后注入新的 PDMA 溶液就能进入下一次分析, 再次运行之间不需要对毛细管内壁进行任何处理, 空柱毛细管能够循环使用 100 次而不会影响其分离能力。低分子量的 PDMA 用作筛分介质时^[36, 37], 一般使用较高的浓度(如 6.5%), 如果分子量超过 9.8×10^4 时, 分离度提高很小, 但粘度会明显提高。Song 等^[38]用分子量为 5.0×10^6 的 PDMA 在毛细管电泳中进行 DNA 分离, 在室温下 2.15% PDMA 溶液、电压 150v/cm、有效柱长 60cm、在 96min 内测到 800bp 的分离度(resolutions, Rs)为 0.15 (测到 1000bp 时 Rs 为 0.13)。

1.5 聚 *N*-羟乙基丙烯酰胺 (Poly-*N*-hydroxyethylacrylamide, PHEA)

Albarghouthi 等^[39]第一次把 HEA 用作 DNA 的毛细管筛分介质, 实验证明 *N*-羟乙基丙烯酰胺单体比丙烯酰胺(acryl amide, AA)或 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(*N,N*-dimethylacrylamide, DMA)亲水性还要强, 因此作者认为 PHEA 应该比 LPA 有更高的亲水性, 从而能有效减少与 DNA 等生物大分子间的相互作用, 进一步提高介质的筛分性能。PHEA 具有 PDMA 的同样的涂敷能力, 能有效消除电渗流, 数据显示连续电泳 600h 电渗流仍能忽略不计, 同时这种新型介质的粘度随着剪切速率的提高($0.1s^{-1} \sim 1000s^{-1}$)能够降低两个数量级($10^5 \sim 10^3$ cp), 因此在微芯片毛细管电泳中有着很好的应用前景, 但这种介质分子量很小, 因此需要较高的浓度, 分离时间较长。在空柱下用 6%(w/v)的 PEA(5.2×10^6 Da)溶液 3h 对 DNA 进行排序分析, 读写长度达 620bp, 准确率为 98.5%。PHEA 对蛋白质分离也取得了很好的效果^[40]。

另外, 聚乙烯醇^[41](poly vinyl alcohol, PVA)、聚 *N*-异丙基丙烯酰胺^[42]、乙氧基乙醇取代的聚丙烯酰胺^[43, 44][poly (*N*-acryloylaminoethoxyethanol), PAAEE]和 *N*-丙醇取代的聚丙烯酰胺^[45](poly (*N*-acryloylaminopropanol), PAAP]等聚丙烯酰胺的衍生物也被一些小组用来对 DNA 进行分离或排序分析。

2 共聚物

2.1 无规共聚物

理想的筛分介质需要很强的亲水性、适度的粘度, 还要具有自涂敷功能。聚合物性质是由其组成及结构决定的, 目前合成的均聚物无法同时满足上述条件, 因此, 用分别具有筛分能力和涂敷功能的单体合成的无规共聚物成为一种新型的毛细管电泳分离 DNA 的筛分介质。如 Song 等^[46]利用聚丙烯酰胺优秀的 DNA 筛分能力和 PDMA 良好的自涂敷功能, 用自由基聚合方法按 AA:DMA 分别为 3:1, 2:1, 1:1 的比率合成不同组成的无规共聚物, 实验发现 P(AA-co-DMA)(3:1)分离效果最好, 用未涂敷毛细管在优化条件下 80min 内对 699bp 分离, 分离度达 0.55, 对 963 bp 分离时分离度达 0.30。用 P(AA-co-DMA)(7:3)对 dsDNA 片段分离时也取得了很好的效果^[47]。Chiari 等^[48, 49]合成 AA 与 β -吡喃型葡萄糖共聚物, AA 与葡萄糖酰丙胺无规共聚物用于 dsDNA 的分离, 这类聚合物粘度比相同分子量的聚丙烯酰胺低 2~3 个数量级, 且具有自涂敷能力。

Sassi 等^[50]用自由基聚合合成的 DMA 和 *N*-二乙基丙烯酰胺(*N*-diethylacrylamide, DEA)的无规共聚物是一种温敏性 DNA 筛分介质, 2% 聚合物溶液的粘度在 20℃ 为 100cp, 当温度升高到 50℃ 时粘度会迅速下降到 5cp, 而且这种聚合物还具有很好的毛细管涂敷能力。用 7.35% P(DMA-co-DEA)[DMA(4.0×10^6 Da):DEA=47:53]在 78min 内对 463bp 排序准确率达到 97%^[51]。

聚乙氧基乙基丙烯酰胺(*N*-ethoxyethylacrylamide, NEEA)和乙氧基甲基丙烯酰胺(*N*-methoxyethylacrylamide, NMEA)是另一类温敏性无规共聚物^[52], 20~35℃ 内聚合物溶液的粘度非常低, 但当温度超过 35℃ 时溶液的粘度会迅速上升, 用分子量约为 2×10^6 的 P(NMEA-co-NEEA)(NMEA:NEEA=9:1)对 600bp 排序准确率高达 98.5%。

2.2 嵌段共聚物

不同单体共聚得到的嵌段共聚物不仅能同时具有各单体形成的均聚物的优点, 还能形成不同的结

构。低分子量的三嵌段共聚物聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷(PEO₉₉-PPO₆₉-PEO₉₉; 12.7kDa)是目前在 DNA 分离中研究最多的嵌段共聚物,这种聚合物不仅具有动态涂敷能力,而且其粘度可以根据温度调节,在 5℃ 下 25% (w/v) PEO₉₉-PPO₆₉-PEO₉₉ 粘度不足 50cp,这样就极大地方便了微芯片毛细管的进样操作,但在临界温度 20℃ 以上时溶液的粘度迅速增到 250cp,提供了类似凝胶的网络结构。PPO 形成聚合物的核,两段 PEO 在外面形成冠状结构^[53~56],由于聚合物溶液浓度太高(20% 以上),形成网络结构的孔径很小,因此更适合对小片段 DNA 的分离^[57~60]。Song^[61] 等使用这种聚合物溶液 5min 在 1.5cm 的有效长度的微芯片毛细管内对小片段的 DNA 进行有效地分离,理论塔板数为 104。另外,一种花瓣状的由 4% (2.9 × 10³ Da) B₆E₄₆B₆ (polyoxybutylene-polyoxyethylene-polyoxybutylene) 和 4% (1.3 × 10⁴ Da) B₁₀E₂₇₀B₁₀ (混合物溶液同样具有动态涂敷能力和粘度的温敏性特征^[62,63],在 3℃ 下粘度为 2000cp,而 15℃ 时,粘度达 2400cp,在 20min 内用 10cm 的毛细管能对 100bp 的 dsDNA 有效地分离。

2.3 接枝共聚物

基于 DNA 片段能够按照分子大小不同被筛分介质分离的机理,支化聚合物应该有着比线形聚合物更好的分离能力,因为在临界浓度以上,如果 DNA 片段尺寸比线性聚合物在溶液中形成网络的孔径大时,如爬行理论模型^[64]所示 DNA 分子调整构型通过比自身小的孔径得到分离,同时网络本身也会自动调节增大孔径让 DNA 片段通过,但在柔性线形聚合物溶液内形成的交缠网络稳定性差,DNA 片段如果无法迅速通过孔径时,会导致分离度降低^[65,66]。支化聚合物能够通过支链之间及支链与主链间的相互作用,使得聚合物溶液形成的孔径较为稳定,提高分离能力。

2.3.1 聚 *N*-异丙基丙烯酰胺-*g*-聚环氧乙烷 Liang 等^[67,68] 用聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 [poly (*N*-isopropylacrylamide), PNIPAM] 作为主链,环氧乙烷为支链,得到 PNIPAM-*g*-PEO,室温下对 pBR322/Hae III dsDNA 进行分离,123/134 碱基对的分离度达到 1.4。而 Sudor 等^[69] 用聚丙烯酰胺为主链,PNIPAM 为支链,并对主链支链的大小及聚合物的流体力学进行了分析,发现长链(1.5~2.0 × 10⁶)聚丙烯酰胺接枝少量(小于 10%)低分子量(1.0 × 10⁴)的 PNIPAM 在 1h 内对 800bp DNA 进行单个碱基对的分离,分离度可达到 0.5。PNIPAM 形成的支化聚合物粘度随着温度改变能明显改变,在适宜温度下方方便了进样操作,因而在微芯片毛细管中有着广泛的应用前景。

2.3.2 聚丙烯酰胺-*g*-聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺 聚丙烯酰胺有很强的亲水性,而聚 *N,N*-二甲基丙烯酰胺有优秀的毛细管涂敷功能,因此 Barbier 等^[70] 利用两种聚合物的不同性质以聚丙烯酰胺为主链, *N,N*-二甲基聚丙烯酰胺为支链合成梳形聚合物,能够有效地抑制电渗流,对 100~1500 bp 的 ssDNA 进行分离,800bp 时分离度达到 0.3,但没有应用到 DNA 的排序工作中。

3 共混聚合物

共混聚合物是另一类被广泛研究的 DNA 筛分介质,利用不同聚合物的不同性质来进一步提高聚合物的筛分能力。以上各种共聚物虽然有很多优点,但聚合物的分子量一般都比较小,无法对长片段的 DNA 排序分析,基本上都用于 DNA 的分离,而共混聚合物则可以将不同分子量的或不同种类的聚合物混合以用于 DNA 的分离和排序。Yueng 等用不同分子量的 PEO 分离 dsDNA^[71] 和 ssDNA^[72,73],发现低分子量的聚合物对小片段的 DNA 分离效率高,而高分子量的聚合物更有利于大片段的 DNA 分离。因此不同分子量的聚合物共混对不同大小片段的 DNA 都能得到很好的分离。HEC^[74], LPA^[75,76] 等不同分子量的混合物也都能成功地对 DNA 分离或排序。

共混聚合物虽然具有上述优点,但有时不同类型的聚合物共混时容易发生相分离,导致无法对 DNA 进行分离,如 PEO 和 HPC 的混合物^[77] 分离效率特别差。Song^[78] 用低分子量的 LPA (2.2 × 10⁶) 与不同分子量的 PDMA (8.0 × 10³, 4.7 × 10⁵, 2.1 × 10⁶) 共混时发现 PDMA 分子量越高,混合物内占的组分越大,聚合物间的相分离越明显,分离效果也越差。但用 2.5% 的 LPA 与 0.2% 的低分子量的 PDMA (8 × 10³) 混合溶液能对 730bp 很好地分离。

4 准互穿网络聚合物

互穿网络结构是由两种或两种以上交联聚合物相互贯穿而形成的聚合物网络,交联可以是物理交联也可以是化学交联,但相互贯穿的聚合物之间没有共价键交联作用,聚合物形成的交联网络能够减少宏观相分离,因此形成的网络结构比聚合物共混方法形成的网络更为稳定。根据制备方法,IPN 可分为分步 IPN 和同步 IPN。首先制备交联聚合物网络 A,再用含引发剂和交联剂的单体 B 使网络 A 充分溶胀,然后使单体就地聚合形成互穿网络,这是分步 IPN;而同步 IPN 的制备过程是将两种网络的合成原料均匀混合,并使两种网络以互不干扰的方式同时进行聚合,最后形成互穿聚合物网络。若两种网络同时达到凝胶点,两者贯穿不充分,两种网络先后达到凝胶点,则网络贯穿程度高,网络间存在一定的接枝反应,则更利提高它们的混溶程度。

但典型的 IPN 不适合作为毛细管电泳分离 DNA 的筛分介质,因为交联的 IPN 只能溶胀而无法溶解,因此 Song^[79] 小组合成由 LPA 和 PVP 形成的准互穿网络结构对 dsDNA 进行分离,把丙烯酰胺溶解在线形 PVP(1×10^6 Da)缓冲溶液内于氮气保护下自由基引发聚合,得到 LPA 与 PVP 互穿的网络结构,并由光散射实验加以证明。IPN 内的 LPA 分子量约 4×10^5 ,这种结构综合利用了 PVP 粘度较低且具有自涂敷功能的优点和 LPA 优良的分选性能,在 6.5min 内 2%PVP 和 1%PAM(4×10^5)的混合物溶液可以将 pBR322/Hae III dsDNA 标准样品的 22 个片段很好地分开,其中包括 123/124 碱基对,理论塔板数超过 107。Wang 等^[80]用 PDMA 代替 LPA 与 PVP 形成无交联的 IPN 结构对 R322/Hae III dsDNA 标准样品进行分离,因为 PDMA 也具有优秀的自涂敷能力,因此能进一步减少毛细管的电渗流,15min 内用 4%的 PVP 和 4%PDMA 形成的准 IPN 结构的混合物对样品的 22 个 DNA 片段能很好地分离,其中 123/124 碱基对的分离度达到 1.0 以上。许旭等^[81]也合成了这种结构的聚合物可对 dsDNA 标准样品进行有效的分离。这种在缓冲液内合成 IPN 的方法简便,产物无需处理就可直接用于 dsDNA 的分离,但不能用于 ssDNA 分离和测序,可能是因为所使用的缓冲溶液体系影响了聚合反应,使 LPA 分子量过低,不利于形成稳定的网络。最近 Wang 等^[82]对上述方法进行了改进,在高分子量的 LPA 水溶液内引发聚合 DMA 得到准 IPN 聚合物,调节 AA 与 DMA 的比率发现,在提供足够涂敷能力条件下 DMA 含量越少分离效率越好,这是因为 DMA 含量太高会导致相分离,降低聚合物的分离能力。用 2.5%这种结构(LPA 4.5×10^6 , AA:DMA=11:1)对 pGEM-3Zf(-) ssDNA 样品分离 617bp 时分离度为 0.63,1000bp 时的分离度仍达 0.3。在对 DNA 进行排序分析中他们使用含高分子量 LPA(7.6×10^6)的 2.0%IPNs(AA:DMA=11:1)溶液在 39min 内读写长度达 1000bp,60min 内 1200bp。同目前商业应用的 DNA 筛分介质(LPA 和 POP-6)比较中发现这种聚合物 35min 内对 700bp 排序准确率达到 99.6%,37min 内对 750bp 排序准确率达 98.0%。

5 微交联纳米凝胶聚合物(Sparsely cross-linked “nanogels”)

凝胶毛细管电泳在 DNA 测序分析中有着很高的分离度,但由于柱子制备过程及分离过程存在的不足,目前在 DNA 排序仪中已经被无胶筛分毛细管电泳代替,由聚合物在缓冲溶液内形成网络结构来对 DNA 排序分析。凝胶毛细管电泳内的筛分介质一般由一步法合成,无法分析介质的许多物理特性,无胶筛分的介质可以通过许多方法对其溶液性质进行研究,从而能够更好地理解聚合物与 DNA 间的相互关系,提出更好的筛分机理,但无胶筛分介质形成的网络结构不够稳定,导致分离度下降,因此 Doherty 等^[83]在合成高分子量的聚丙烯酰胺时加入少量的甲叉双丙烯酰胺[$<10^{-4}$ mol%, N, N-methylenebisacrylamide (Bis)],使 LPA 有轻微交联,作者称为纳米级交联聚合物,通过共价键来提高聚丙烯酰胺溶液中形成的网络的稳定性,但由于交联度极小,聚合物仍能保持 LPA 的流体力学性质。2h 内的读写长度为 666bp,比同样条件下的 LPA 筛分能力提高了 10.4%。在这种结构内加入少量的低分子量(5.0×10^6)或超高分子量的 LPA(2.0×10^7)能够提高对短片段和长片段 DNA 的筛分能力^[84],2.5%的微交联纳米凝胶聚合物中加入 0.25%超高分子量的 LPA 对 ss-DNA 排序分析中发现最大读写长度 717bp,准确率达到 98.5%。此外作者把这种新的结构应用于微芯片毛细管电泳,发现结果也非常理想(结果未报告)。

6 小结

无胶筛分介质代替凝胶筛分介质是毛细管电泳分离 DNA 史上的一个里程碑,但单一均聚物很难同时具有高的亲水性、强的毛细管涂敷能力、优良的筛分性能和适当的粘度。而共聚物则能综合各均聚物的优点来提高毛细管电泳对 DNA 的分离能力。均聚物在溶液中能形成交缠网络结构,由于没有交联作用,网络并不稳定,读写长度有限。接枝聚合物通过支链与其他链间相互作用能提高网络的稳定性,嵌段共聚物可以利用链间的不同性质形成胶束结构,纳米级交联聚合物在不影响聚合物溶液的流动性下引入微量的共价键可以进一步提高网络的稳定性,分离效果明显提高。准 IPN 聚合物不仅能够减少宏观相分离,形成的网络结构也相对稳定,是目前由不同种类单体合成共聚物的较好的方法。近年来微芯片毛细管迅速发展,而目前的筛分介质发展滞后,合成同时具有更高的筛分能力和更好的自涂敷能力的聚合物仍是微芯片毛细管发展急于解决的问题之一。

参考文献:

- [1] 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996, 121.
- [2] Cheng J. Prog Biochem Biophys, 1995, 22; 223.
- [3] Lagally E T, Scherer J R, Blazej R G, et al. Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2003, Transducers Research Foundaion, inc, Ohio, USA, 2003, 1283.
- [4] Kim Y, Yeung E S. J Chromatogr A, 1997, 781; 315.
- [5] 王前, 许旭. 化学进展, 2003, 15; 275.
- [6] Ruiz-Martinez M C, Berka J, Belenkii A, et al. Anal Chem, 1993, 65; 2851.
- [7] Carrilho E, Ruiz-Martinez M C, Berka J, et al. Anal Chem, 1996, 68; 3305.
- [8] Goetzinger W, Kotler L, Carrilho E, et al. Electrophoresis, 1998, 19; 242.
- [9] Marina C, Camen C, Giovanna P, et al. Electrophoresis, 2003, 24; 2322.
- [10] Marina C, Marcella C, Ivan R, Sergio C. Electrophoresis, 2003, 24; 3793.
- [11] Fung W N, Yeung E S. Anal Chem, 1995, 67; 1913.
- [12] Preisler J, Yeung E S. Anal Chem, 1996, 68; 2885.
- [13] Ueno K, Yeung E S. Anal Chem, 1994, 66; 1424.
- [14] McGregor D A, Yeung E S. J Chromatogr, 1994, 680; 491.
- [15] Strege M, Lagu A. Anal Chem, 1991, 63; 1233.
- [16] Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tshako M. J Chromatogr, 1993, 653; 329.
- [17] Mac Crehan W A, Rasmussen H T, Northrop D M. J Liq Chromatogr, 1992, 15; 1063.
- [18] Barron A E, Blanch H W, Soane D S. Electrophoresis, 1994, 15; 597.
- [19] Butler J M, McCord B R, Jung J M, et al. J Chromatogr, 1994, 658; 271.
- [20] Liu W G Y, Kuhr W G. Anal Chem, 1999, 71; 1668.
- [21] Dolkin V, Gurske W A. Electrophoresis, 1999, 20; 3373.
- [22] Kheterpal I, Mathies R A. Anal Chem, 1999, 71; 31A.
- [23] Barron A E, Soane, D. S, Blanch H W. J Chromatogr, 1993, 652; 3.
- [24] Tian H, Landers J P. Anal Biochem, 2002, 309; 212.
- [25] Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tshako M. J Chromatogr, 1993, 653; 329.
- [26] Mitnik L, Salomé L, Viovy J L, Heller C. J Chromatogr A, 1995, 710; 309.
- [27] Sanders J C, Breadmore M C, Kwok Y C, et al. Anal Chem, 2003, 75; 986.
- [28] 郭棚, 薛俊, 林炳承. 科学通报, 1996, 41; 1090.
- [29] Hjertén S, Valtcheva L, Elenbring K, et al. J Liq Chromatogr, 1989, 12; 2471.
- [30] Schwartz H E, Ulfelder K, Sunzeri F J, et al. J Chromatogr, 1991, 559; 267.
- [31] Cheng J, Kasuga T, Mitchelson K R, et al. J Chromatogr A, 1994, 677; 169.
- [32] Kim Y, Morris M D. Anal Chem, 1994, 66; 1168.
- [33] 丁晓萍, 廖杰, 刘晓达, 等. 色谱, 1998, 16; 485.
- [34] Chiari M, Micheletti C, Nesi M, et al. Electrophoresis, 1994, 15; 177.
- [35] Madabhushi R S. Electrophoresis, 1998, 19; 224.

- [36] Madabhushi R S, Menchen S M, Efcavitch J W, Grossman P D. USP 5, 567, 292, 1996.
- [37] Swerdlow H, Zhang J Z, Chen D Y, et al. Anal Chem, 1991, 63; 2835.
- [38] Song L, Liang D, Fang D, et al. Electrophoresis, 2001, 22; 1987.
- [39] Albarghouthi M N, Buchholz B A, Huiberts P J, et al. Electrophoresis, 2002, 23; 1429.
- [40] Albarghouthi M N, Stein T M, Barron A E. Electrophoresis, 2003, 24; 1166.
- [41] Kleemib M H, Gilges M, Schomburg G. Electrophoresis, 1993, 14; 515.
- [42] 刘中华, 周平, 邓延倬. 分析科学学报, 2004, 20; 16.
- [43] Chiari M, Micheletti C, Nesi M, et al. Electrophoresis, 1994, 15; 177.
- [44] Talmadge K W, Tan A K, Zhu M. J Chromatogr A, 1997, 781; 335.
- [45] Gelfi C, SimoAlfonso E, Sebastiano R, et al. Electrophoresis, 1996, 17; 738.
- [46] Song L, Liang D, Kielescawa J, et al. Electrophoresis, 17; 729.
- [47] Ren J, Fang Z. J Chromatogr B, 761; 139.
- [48] Chiari M, Damin F, Melis A, et al. Electrophoresis, 1998, 19; 3154.
- [49] Chiari M, Cretich M, Riva S, et al. Electrophoresis, 2001, 22; 699.
- [50] Sassi A P, Barron M G, Alonoso-Amigo D Y, et al. Electrophoresis, 1996, 17; 1460.
- [51] Buchholz B A, Doherty E A S, Albarghouthi M N. Anal Chem, 2001, 73; 157.
- [52] Kan C W, Doherty E A S, Barron A E. Electrophoresis, 2003, 24; 4161.
- [53] Wu C, Liu T, Chu B, Schneider D, Graziano V. Macromolecules, 1997, 30; 4574.
- [54] Wanka G, Hoffmann H, Ulbricht W. Macromolecules, 1994, 27; 4145.
- [55] Wu C, Liu T, Chu B. Electrophoresis, 1998, 19; 231.
- [56] Liang D, Chu B. Electrophoresis, 1998, 19; 2447.
- [57] Menchen S M, Johnson B, Winnik M. A, Xu B. Electrophoresis, 1996, 17; 1451.
- [58] Rill R L, Locke B R, Liu Y, et al. Proc Natl Acad Sci, USA 1998, 95; 1534.
- [59] Rill R L, Liu Y, van Winkle D H, Locke B R. J Chromatogr A, 1998, 817; 287.
- [60] Epperson J D, Dodge J, Rill R L, Greenbaum N L. Electrophoresis, 2001, 22; 771.
- [61] Song L, Fang D, Kobos R K, Pace S L, Chu B. Electrophoresis, 1999, 20; 2847.
- [62] Liu T, Liang D, Song L, Nace V M, Chu B. Electrophoresis, 2001, 22; 449.
- [63] Liang D, Liu T, Song L, Chu B. J Chromatogr A, 2001, 909; 271.
- [64] Lerman L S, Frisch H L. Biopolymers, 1982, 21; 995.
- [65] Pentoney S L, Konrad K D, Kaye W. Electrophoresis, 1992, 13; 467.
- [66] Bae Y C, Soane D J. J Chromatogr A, 1993, 652; 17.
- [67] Liang D, Song L, Zhou S, et al. Electrophoresis, 1999, 19; 2856.
- [68] Liang D, Song L, Zhou, S. et al. Macromolecules, 1999, 32; 6236.
- [69] Sudor J, Barbier V, Thirot S, et al. Electrophoresis, 2001, 22; 720.
- [70] Valessa B, Brett A B, Annelise E B, Jean-louis V. Electrophoresis, 2002, 23; 1441.
- [71] Chang H T, Yeung E S. J chromatogr B, 1993, 669; 113.
- [72] Fung E N, Yeung E S. Anal Chem, 1995, 67; 1913.
- [73] Iki N, Yueng E S. J chromatogr A, 1996, 731; 273.
- [74] Isenberg A R, McCord B R, Koons B W. Electrophoresis, 1996, 17; 1505.
- [75] Salas-Solano O, Carrilho E, Kotler L. Anal Chem, 1998, 70; 3996.
- [76] Zhou H H, Miller A W, Sosic Z, et al. Anal Chem, 2000, 72; 1045.
- [77] Kim Y, Yeung E S. J chromatogr A, 1997, 781; 315.
- [78] Song L, Liang D H, Chen Z J. J chromatogr A, 2001, 915; 231.
- [79] Song L, Liu T, Liang D, et al. Electrophoresis, 2001, 22; 3688.
- [80] Wang Y M, Liang D H, Hao J C, et al. Electrophoresis, 2002, 23; 1460.
- [81] Wang Q, Xu X. Chin Chem Lett, 2003, 14; 1278.
- [82] Wang Y M, Liang D H, Ying Q C, Chu B. Electrophoresis, 2005, 26; 126.
- [83] Doherty E A S, Kan C W, Annelise E B. Electrophoresis, 2003, 24; 4170.
- [84] Erin A S D, Cheuk-Wai K, Brian M. Anal Chem, 2004, 76; 5249.

(下转第 97 页)

[113] Pospisil J. Angew Makromol Chem, 1988, 158/159: 221~231.

[114] Lau W W Y, Pan J Q. Desk Ref Funct Polym, by Arshady R. Washington D C: ACS, 1997. 621~634.

[115] 潘江庆. 高分子通报, 1992, (3): 138~146.

[116] 田丰涛, 黄德音, 张青. 中国塑料, 2000, 14(12): 12~15.

[117] 马洪玺. 金山油化纤, 2000, (2): 36~40.

[118] Minagawa M, Kikkawa K. Mackromol Chem, Macromol Symp, 1993. 70, 433~443.

[119] Vogl O, Stoeber L, Sustic A, Crawford J. ACS Symp Ser, 1999, 722: 298~311.

[120] Vogl O, Xi F, Jaycox G D, et al. Prog Pac Polym Sci, Proc Pac Polym Conf, by Anderson B, Imanishi Y. Berlin: Springer, 1989. 39~49.

[121] Pospisil J, Habicher W-D, Nespurek S. Polym Polym Comps, 2000, 8(8): 519~528.

[122] 张泽明. 精细石油化工, 1998, (2): 51~55.

Photo-aging and Photostabilization of Polymers and Light Stabilizers(II)

WU Mao-ying

(Faculty of Chemical and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China)

Abstract: Most polymeric materials, including plastics、rubbers、fibers、coatings and so on, underwent photo-aging when used outdoors and their services lifes were thus cut down. In order to protect effectively the polymeric materials from photo-deterioration, the mechanisms of photo-aging and photostabilization of polymers had been studied widespreadly and several types of light stabilizers developed successively. But since the photo-aging of polymers had been being made more and more complicated by the continuously extended ranges of use and deteriorated environment and their photo-protection becoming more and more difficult, the study of the mechanisms of photo-aging and photostabilization of polymers and development of light stabilizers were very active all the way at home and abroad. In the second part of this paper, the action mechanisms of light stabilizers were expounded and the advances in development of light stabilizers were reviewed.

Key words: Polymer; Light stabilizer; Photostabilization; Mechanism

(上接第 81 页)

Advances in the Research of Polymers for DNA Separation by Capillary Electrophoresis

ZHANG Wen-long, WANG Yan-mei

(Department of Polymer Science and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: This paper reviews the advances in the research of polymers for DNA separation by capillary electrophoresis. The separation ability of these polymers, which has different molecular architecture, such as homopolymers, random copolymers, block copolymers, graft copolymers, quasi-interpenetrating network and sparsely cross-linked “nanogels” polymers are discussed.

Key words: Capillary electrophoresis; Microchip-based capillary electrophoresis; DNA separation; DNA sequencing